

乳酸菌検出用培地への有孢子乳酸菌の生育

中山大樹

(昭和45年3月10日受理)

Growth Capability of the Spore-Bearing Lactic Acid Bacteria in the Lactic Acid Bacteria Detecting Medium

By Ooki NAKAYAMA

Lactic acid bacteria detecting medium, called "Nakagawa medium", is a semi-liquid medium, which may be used after boiling for a moment in order to kill contaminated lactic acid bacteria only. Because, this medium is devised not to allow the growth of any microbes other than the lactic acid bacteria, which never produce heat resistant spores.

In nature, however, the author has demonstrated a wide distribution of the spore-bearing lactic acid bacteria, which produce heat resistant endo-spores as same as the ordinary bacilli, and on the other hand, they appear as lactic acid bacteria in the sugared media. It is of interest whether such organisms can grow in the above mentioned medium or not.

In this paper, nine strains which represent each group of the spore-bearing lactic acid bacteria; *Bacillus coagulans* Hammer, *B. laevolacticus* Nakayama et al., *B. racemilacticus* Nakayama et al. and the representatives of *Sporolactobacillus* Kitahara et al.; were tested.

Vegetative cells of the test organisms were able to propagate in the medium almost as same as the true lactic acid bacteria, but heated spores of the test organisms propagated hardly.

Eleven test tubes with the medium were inoculated with eleven specimens of soil, boiled and incubated at 30 °C for several days, and eight became turbid. From each tube, one strain of *B. coagulans* was isolated. One strain of them was identified with a flagella lacking variety.

緒 言

醸造原料、醸造物等の中に混在する乳酸菌には、さまざまな功罪があるので、品質管理上、その実態を把握しておくことが望ましいが、他の菌が多量に共存するところから乳酸菌だけを分離検出することは容易でない。乳酸菌簡易検出用培地は、この目的のために、

朝日麦酒株式会社中央研究所の中川淳博士によって考案された半液状培地であって、有孢子細菌は生育できないので煮沸滅菌して使えばよく、オートクレーブは必要ないとされている¹⁾。

一方、筆者らの研究により、土壌、穀類等には有孢子乳酸菌が存在していることが明らかにされている。有孢子乳酸菌は、有孢子細菌であって、しかも乳酸菌としての面を持っているので、この種の菌が中川培地に対してどのような挙動をとるかは微妙な問題となる。例えば、作業員の手などを通じて、中川培地を調製する途中で、有孢子乳酸菌によって汚染されたような場合、その孢子は煮沸に耐える。もしこれが、後で繁殖するようであると、煮沸後に加えた試料から来た乳酸菌であるか否か、わからなくなってしまう。

そこで、この点を検討するよう、中川博士から依頼されたが、この問題は、有孢子乳酸菌は、どの程度に乳酸菌的であるか、という観点からも興味深いので、若干の実験をおこなった。

供 試 料

1. 供 試 菌 株

有孢子乳酸菌は、生産する乳酸の旋光性、カタラーゼの有無、sporangiumの形などによって区別されるので、保存菌の中から代表的な9株を選び、これに、工業的に製造、販売されている乾燥孢子末ラクリスおよび、対照として無孢子乳酸菌 *Pediococcus pentosaceus* S-12²⁾ を用いた。以上の菌株の概要を TABLE I に示す。

TABLE I
Bacterial Strains Tested

Strain	Catalase	Lactic acid	Remarks
P-22 <i>Bacillus coagulans</i> ^{3) 4)}	+	L (+)	
M-5 <i>B. racemilacticus</i> ⁵⁾	+	DL	
M-7 <i>B. laevolacticus</i> ⁵⁾	+	D (-)	
M-105 <i>B. myxolactis</i> ⁶⁾	+	〃	Clostridia like
M-33 <i>Sporolactobacillus sp.</i> ⁵⁾	-	DL	
M-60	〃	〃	Aerobic
M-86	-	DL+D (-)	
M-45	-	D (-)	Spores small
M-20	-	〃	Spores large
S-12 <i>Pediococcus pentosaceus</i>	(-)*	DL	As control

* Pseudo-catalase positive

2. 培 地

基礎培地

酵母エキス (エビオス薬品工業株式会社製ミースト P2G) 0.5%, ポリペプトン 0.5%,

Salt A 0.5%, Salt B 0.5%, Salt C 0.1%

但し Salt A : KH_2PO_4 , K_2HPO_4 各々 5%,

Salt B : $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3%, NaCl , $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 各々 0.1%, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $3(\text{NH}_4)_2\text{O} \cdot 7\text{MoO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 各々 0.01%

Salt C : $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1%, $\text{Na}_3\text{-citrate}$ 2.7%

ブドウ糖寒天 : 基礎培地に酢酸ナトリウム 0.2%, ブドウ糖 0.8%, 沈降炭酸カルシウム 0.4%, 寒天 1.8% を加え, 斜面に固める。有孢子および無孢子乳酸菌の栄養細胞を得るためおよび生菌数測定のための平板培養用に用いる。

孢子用寒天 : 基礎培地にブドウ糖 0.2%, 寒天 1.8% を加え, 斜面に固める。*B. coagulans* P-22 の孢子形成に用いる。

澱粉寒天 : 基礎培地に酢酸ナトリウム 0.2%, ブドウ糖 0.1%, 可溶性澱粉 0.8%, 沈降炭酸ナトリウム 0.4%, 寒天 1.8% を加え, 斜面に固める。*B. coagulans* 以外の有孢子乳酸菌の孢子形成用に使う。

対照培地 : 基礎培地に酢酸ナトリウム 0.2%, ブドウ糖 0.8%, 寒天 0.1% を加える。中川培地に対する対照として用いる。

以上いずれも pH は 7.0, 殺菌条件は 115 °C 15 分とする。

中川培地 : 粉末状の混合物で, このもの 4 g を熱湯 100 ml を加えて溶解分注し, 数秒間煮沸して滅菌する。オートクレーブはかけない。半液状培地なので, 試験管に 5 ml 分注, 直立させたまま用いる。調製後の培地 1 l 中の成分は次のとおりとされている。

(単位は g)

酵母エキス 5, ペプトン 5, グルコース 11.2, マルトース 5, 酢酸ナトリウム 8, クエン酸 2.2, 磷酸第 1 カリウム 0.2, 塩化カリウム, 塩化カルシウム, 硫酸マグネシウム各 0.1, 塩化第 1 鉄 0.001, アスコルビン酸 2, Tween 80 0.05, DL-メバロン酸 0.005, アクチジオン 0.05, レサズリン・ナトリウム塩 0.003, 寒天 0.7, pH 5.2.

実験方法

1. 栄養細胞の生育試験

ブドウ糖寒天斜面に植え継いで 30 °C で培養して得られた供試菌の若い細胞を生理的食塩水に懸濁し, 約 $2 \times 10^5/\text{ml}$ および $1 \times 10^3/\text{ml}$ の懸濁液を作り, 種とする。一方, 中川培地を調製, 煮沸, 冷却しておき, これに種を 0.1 ml ずつ接種し, ミキサーで混合して, 30 °C で培養し, 肉眼で混濁が認められるようになる迄の日数をしらべる。対照培地についても同じことをおこない, 種は平板培養により, 生菌数を確認しておく。

2. 孢子の発芽生育試験

P-22 は孢子用寒天斜面に接種して 50 °C に 3 日, 他の有孢子乳酸菌は澱粉寒天斜面に接種して 30 °C に 7 日培養して孢子を形成させて, 孢子の $2 \times 10^5/\text{ml}$ および $1 \times 10^3/\text{ml}$ の懸濁液を作り, これを煮沸前の中川培地および対照培地に 0.1 ml ずつ接種し, 数秒間

煮沸した後、30 °C で培養し、混濁が認められる迄に要する日数をしらべる。孢子懸濁液は煮沸後平板培養して生存孢子数を確認する。

3. 土壤接種試験

有孢子乳酸菌は、植物の根のまわりの土壤中に多く存在することが知られているので、未煮沸の中川培地を分注した試験管12本に、山梨大学周辺の山林の草のまわりの土を米粒大ずつ接種し、煮沸後 30 °C で培養し、14日以内に混濁を生じたものは乳酸菌分離の常法に従い、沈降炭酸カルシウム入りブドウ糖寒天を用いて平板培養して、炭酸カルシウムを溶解するコロニーを分離した。

一方、同種の試料を対照培地にも接種して煮沸し、こちらは枯草菌等の発育を抑制するためにデシケーターに入れて水素雰囲気中で 30 °C で培養し、混濁を生じたものについては同様な方法で菌を分離した。

分離菌は主要な菌学的性質をしらべて固定した。

実験結果

1. 栄養細胞の生育試験

実験結果を TABLE II に示す。

即ち、対照培地には、すべての菌が2日以内に生育し、*Pediococcus* は中川培地にも2日以内に生育する。有孢子乳酸菌は中川培地に2日以内には生育しないが、14日以内に、すべて生育する。*Bacillus coagulans*, *B. racemilacticus* および *B. myxolactis* の生育がおそいが、他の菌はカタラーゼの有無に拘らず、3~5日で生育する。これらの点から、有孢子乳酸菌の栄養細胞の中川培地内での挙動は、乳酸菌なみであると言える。

TABLE II

Days Needed for the Growth Initiation in Nakagawa Medium
(Vegetative Cells)

Strains	Cell counts	Nakagawa medium	Control medium	Cell counts	Nakagawa medium	Control medium
P-22	2.6×10^4	14	<2	0.9×10^2	14	<2
M-5	2.8 //	14	//	1.8 //	14	//
M-7	1.9 //	3	//	1.4 //	4	//
M-105	2.4 //	8	//	0.7 //	14	//
M-33	2.8 //	3	//	1.2 //	5	//
M-60	1.2 //	3	//	0.8 //	4	//
M-86	2.3 //	4	//	1.1 //	4	//
M-45	1.6 //	3	//	0.6 //	5	//
M-20	2.2 //	3	//	1.3 //	4	//
S-12	1.5 //	<2	//	1.6 //	<2	//

2. 孢子発芽生育試験

実験結果を TABLE III に示す。

対照培地には、いずれも2日以内に生育したが、中川培地への生育はおそく、特に $10^2/5\text{ ml}$ 台の接種では供試料の約半数が14日培養後にも生育しなかった。機作は不明であるが、有孢子乳酸菌の孢子は、中川培地に対して、乳酸菌よりも、むしろ一般有孢子細菌に近い挙動を示すものと言えよう。

TABLE III
Days Needed for the Growth Initiation in Nakagawa Medium
(Heated Spores)

Strains	Spore counts	Nakagawa medium	Control medium	Spore counts	Nakagawa medium	Control medium
P-22	2.4×10^4	>14	<2	0.6×12^2	>14	<2
Lacris*	1.8 //	8	//	2.1 //	10	//
M-5	1.2 //	>14	//	0.8 //	>14	//
M-7	2.3 //	8	//	2.0 //	8	//
M-105	1.9 //	>14	//	1.7 //	>14	//
M-33	1.6 //	6	//	1.4 //	14	//
M-60	1.1 //	7	//	0.9 //	8	//
M-86	1.7 //	12	//	1.8 //	>14	//
M-45	1.1 //	>14	//	0.7 //	>14	//
M-20	2.2 //	8	//	2.1 //	8	//
S-12	1.5 //	>2	//	1.6 //	>2	//

* Dried spore preparation in sale.

3. 土壤接種試験

土壤試料を中川培地および対照培地に接種して煮沸した後培養し、混濁を生じたものから菌を分離した結果を TABLE IV に示す。

中川培地、対照培地、いずれを用いた場合も、無作為に採集した12種の試料の内8種から有孢子乳酸菌が繁殖し、純粋分離された。

中川培地に生育して来たものは、8株ともブドウ糖培地の pH を4台に下げ、無糖培地にも生育し、55°Cでも30°Cでも増殖し、L(+)の乳酸を作るグラム染色陽性、孢子が端在する桿菌であることから、*B. coagulans* と同定された。

No. 12の試料から得られたものの他は、すべて孢子寒天斜面凝結水中12時間培養の若い菌体は顕微鏡下に運動性を示し、戸田法で染色すると周毛が認められ、また soft agar 法で培養すると、穿刺孔のまわりにひろがって生育するが、No. 12の試料から得られた株は、これらの試験結果がすべて陰性なので、*B. coagulans* の鞭毛欠除変種と考えられる。

筆者が分離保存している約300株の *B. coagulans* は、すべて周毛性のものであり、鞭毛欠除株は極めて珍しいものである。また、*B. coagulans* が孢子形成能、カタラーゼおよび鞭毛を失えば *Lactobacillus* と区別できないものになるので^{7) 8)}、鞭毛欠除株はこの観

TABLE IV

Spore-Bearing Lactic Acid Bacteria Isolated from Soil Specimens

No. of specimens	By Nakagawa medium				By control medium			
	Minimum pH	Growth at 55°C	Lactic acid	Dia- * gnosis	Minimum pH	Growth at 55°C	Lactic acid	Dia- * gnosis
1	4.0	+	L (+)	C	4.6	-	D (-)	L
2					4.2	+	L (+)	C
3	4.2	+	L (+)	C	4.2	+	L (+)	C
4	4.2	+	L (+)	C	4.2	+	L (+)	C
5	4.2	+	L (+)	C	3.9	-	D (-)	L
6	4.2	+	L (+)	C	4.2	+	L (+)	C
7, 8, 10								
9	4.4	+	L (+)	C	4.4	+	L (+)	C
11	4.2	+	L (+)	C	4.2	+	L (+)	C
12	4.0	+	L (+)					

* C : *Bacillus coagulans*, L : *Bacillus laevolacticus*.

点からも興味深いものである。

対照培地に生育して来たものは、6株は *B. coagulans* と同定され、2株はブドウ糖培地の pH を4台またはそれ以下に下げ、無糖培地に生育せず、30°C では増殖するが55°C では全く増殖せず、D (-) の乳酸を作るグラム染色陽性、孢子が端在する桿菌であることから *B. laevolacticus* と同定された。これら8株は、すべて周毛を持ち、運動性を示した。また、これらに孢子を形成させ、中川培地に1白金耳ずつ接種して数秒間煮沸し、培養したところ、12日以内に混濁を生じた。

考 察

有孢子乳酸菌の孢子が $10^4/6 ml$ 台、中川培地に混在していても、煮沸、培養した場合、約1週間以上培養しないと混濁を生じない。孢子数が減少すれば、この期間は更に長くなる。一方、植物が生育している土壌中には、極めてふつうに有孢子乳酸菌が存在している。従って中川培地調製は、なるべく土壌等で汚染されないよう注意しておこなうのがよく、また汚染された可能性がある場合は、培養日数を約1週間以内に限定する方が無難であろう。

有孢子乳酸菌の加熱孢子が中川培地を混濁させにくいのは、発芽したばかりの極めて若い細胞が、通常の栄養細胞と少し異なる性質を示すためかと思われる。

栄養細胞は中川培地中で、通常の乳酸菌と略々変わらない生育を示すので、中川培地を調製加熱後に添加した試料中に有孢子乳酸菌が存在した場合は、乳酸菌として検出されることになる。

要 約

乳酸菌のみが選択的に生育するとされている 乳酸菌簡易検出用中川培地に有孢子乳酸菌が生育するか否かをしらべたところ、各群を代表する9株の有孢子乳酸菌の栄養細胞は、いずれも中川培地に生育した。

有孢子乳酸菌の孢子を中川培地に接種し、加熱して栄養細胞を殺して培養すると、14日培養しても生育しないものが多く、生育するものも、 $10^2/5\text{ ml}$ の接種の場合生育がはじまるのに8日以上を要した。

12点の土壌を中川培地に接種し、煮沸後培養したところ、8点は混濁を生じ、これら、すべてから有孢子乳酸菌 *Bacillus coagulans* が分離された。その内1株は、鞭毛を欠除した変種であった。

終に臨み、中川培地の見本を提供してくださったエビオス薬品工業株式会社の松井敬一氏、朝日麦酒株式会社中央研究所の中川淳博士、実験の一部を担当された永田妙子嬢に深謝する。

尚、この報告の要旨は昭和44年度日本農芸化学会関東支部大会（於・東京農業大学）にて講演した。

文 献

- 1) 中川 淳：ビール有害乳酸菌簡易検出用乾燥培地 日本発酵工学会大会要旨集 21 (1969)
- 2) 中山大樹, 小池弘子：食塩を使わない漬物「スンキ」の乳酸桿菌群について（第1報）菌の分離および桿菌群の同定 醸工, **43**, 157 (1964)
- 3) GORDON, R. E. and N. R. SMITH：Aerobic spore forming bacteria capable of growth at high temperatures. *J. Bact.*, **58**, 327 (1949)
- 4) NAKAYAMA, O. and H. KOIKE：Dimorphism of spore bearing lactic acid bacteria, *Bull. Res. Inst. Ferm. Yamanashi Univ.*, **9**, 1 (1962)
- 5) NAKAYAMA, O. and M. YANOSHI：Spore-bearing lactic acid bacteria isolated from rhizosphere I. Taxonomic studies on *Bacillus laevolacticus* nov. sp. and *Bacillus racemilacticus* nov. sp., *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **13**, 139 (1967)
 —— II. Taxonomic studies on catalase negative strains, *Ibid*, **13**, 155 (1967)
- 6) 中山大樹：有孢子乳酸菌群の分類 農化大会講演要旨集, 315 (1970)
- 7) 中山大樹, 坂口謹一郎：孢子を形成する乳酸生産菌に就て 農化, **23**, 513 (1950)
- 8) 中山大樹, 上野 学：同上（第2報）, 同上, **26**, 117 (1952)